

Etude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linoléique de souches de *Mucor*

G. AGGELIS (1), R. RATOMAHENINA (1), A. ARNAUD (1), P. GALZY (1), P. MARTIN-PRIVAT (2), J. P. PERRAUD (2), M. PINA (3) et J. GRAILLE (3) (*)

Résumé. — L'acide gamma linoléique (GLA) est un acide gras très recherché à cause de ses propriétés biologiques. *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et *Mucor rouxianus* CBS 120-08 sont deux mucorales dont les huiles sont riches en cet acide gras. Ces deux souches ont été cultivées sur différents milieux et certains paramètres de croissance ainsi que la composition en acides gras des triglycérides cellulaires ont été étudiés. La concentration et le type d'azote ainsi que la concentration en glucose dans le milieu de culture influencent de façon importante les compositions des deux souches. Les biomasses obtenues sont d'autant plus pauvres en protéines et riches en matière grasse que le milieu de culture est plus pauvre en azote. La composition générale des huiles est relativement constante, peu dépendante du milieu de culture ; il semble par contre que les deux souches produisent des huiles plus concentrées en GLA dans les cas où les biomasses sont plus pauvres en matières grasses. L'étude de la composition minérale des souches a été effectuée et un milieu optimal a été mis au point. A partir de ce milieu, de bons rendements en matière sèche ainsi qu'une bonne production en GLA ont été obtenus.

INTRODUCTION

L'acide gamma linoléique (GLA) 18:3(n-6) est un acide gras essentiel qui provient de l'acide linoléique 18:2(n-6) par action de la delta 6 désaturase [1-3] et, dans certains cas, de l'isomère de position 18:2(n-9) par action de la delta 12 désaturase [3].

L'organisme humain est parfois incapable de transformer l'acide linoléique en GLA à cause d'une déficience de la delta 6 désaturase [1], d'où l'intérêt d'une production d'huiles riches en GLA, ce qui explique l'effort agronomique actuel pour la recherche et la mise en valeur d'huiles végétales riches en cet acide gras particulier, notamment les huiles d'onagre [4, 5] et de bourrache [6]. Toutefois, certains champignons, notamment les Phycomycètes sont réputés pour contenir dans leurs triglycérides du GLA en quantités importantes [7-9]. D'autre part, il est connu que la limitation de la croissance microbienne par manque d'azote, en présence d'un excès de substrat carboné, provoque l'accumulation de lipides chez de nombreuses levures [10-12].

Dans ce travail, nous avons donc étudié systématiquement l'influence de la composition du milieu, notamment de la concentration et du type d'azote, ainsi que de la concentration en glucose, sur la teneur en matière grasse, en protéines et en GLA de deux souches de *Mucor* : *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et *Mucor rouxianus* CBS 120-08. L'étude de la composition minérale des deux souches a été effectuée et un milieu minéral vitaminé optimal a été mis au point.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique.

Les souches utilisées proviennent du CBS (Central Bureau voor Schimmelcultures de Baarn). Ces souches sont : *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et *Mucor rouxianus* CBS 120-08.

Les souches sont conservées à + 4 °C sur milieu PDA Difco.

Milieu de culture.

a) Préparation des solutions stocks [13]

— *Solution de vitamines* : pantothénate de calcium : 80 mg, thiamine : 80 mg, inositol : 80 mg, pyridoxine : 80 mg, acide nicotinique : 20 mg, biotine : 0,8 mg, eau distillée q.s.p. : 200 ml.

La stérilisation s'effectue sur ultra-filtre en éliminant les premiers ml.

— *Solutions d'oligoéléments* : acide borique : 500 mg, sulfate de cuivre : 40 mg, iodure de potassium : 100 mg, sulfate de manganèse : 400 mg, molybdate de sodium : 200 mg, sulfate de zinc : 400 mg, eau distillée q.s.p. 1 000 ml.

La stérilisation s'effectue à 120 °C pendant 20 min.

— *Solution de chlorure ferrique* : la concentration de cette solution est de 2 g/l. La stérilisation se fait en 20 min à 120 °C.

— *Solution de substance carbonée* : glucose 100 g/l.

La stérilisation s'effectue à 120 °C pendant 20 min.

— *Solutions de substances azotées* : suivant le milieu utilisé, la source d'azote est amenée par une des solutions suivantes : solution de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄

(1) Chaire de génétique et de Microbiologie ENSA-INRA ; 9, place Viala, 34060 Montpellier Cedex (France).

(2) Laboratoire Pharmaceutique Phytodif, Z.I. Les Baronnes, 34980 Prades-le-Lez (France).

(3) Division Chimie des Corps Gras IRHO CIRAD, B.P. 5035 - 34032 Montpellier Cedex (France).

(*) Personne à qui toute correspondance doit être envoyée.

100 g/l, solution de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) 100 g/l ou solution d'urée (H_2NCONH_2) 100 g/l.

La stérilisation des solutions de sulfate et de nitrate d'ammonium s'effectue à 120 °C pendant 20 min, et celle de la solution d'urée sur ultra-filtre en éliminant les premiers ml.

b) Solution de sels minéraux : phosphate monopotassi-

que : 8 g, chlorure de sodium : 0,1 g, sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) : 0,5 g, chlorure de calcium (CaCl_2) : 0,1 g, eau distillée q.s.p. 500 ml.

La stérilisation se fait en 20 min à 120 °C.

A partir des solutions stocks et des solutions de sels minéraux, les milieux minéraux vitaminés sont préparés de la façon indiquée ci-après dans lesquels la solution de chlorure ferrique doit être ajoutée en dernier lieu :

Composition des différents milieux vitaminés (MMV)

| | M M V (1 litre) | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A 1 | A 2 | A 3 | A 4 | B 1 | B 2 | B 3 | B 4 | B 5 | B 6 |
| Solution de vitamines (ml) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Solution d'oligoéléments (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Solution de chlorure ferrique (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Solution de substance carbonée (ml) | 200 | 200 | 200 | 200 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| Solution de sels minéraux (ml) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Solution de sulfate d'ammonium (ml) | 5 | 10 | 20 | 60 | 5 | 10 | 20 | 60 | / | / |
| Solution de nitrate d'ammonium (ml) | / | / | / | / | / | / | / | / | 32 | / |
| Solution d'urée (ml) | / | / | / | / | / | / | / | / | / | 28 |
| Eau distillée stérile (ml) | 288 | 283 | 273 | 233 | 88 | 83 | 73 | 33 | 61 | 65 |

— L'indication A ou B correspond aux différentes concentrations de glucose dans les milieux (A : 20 g/l, B : 40 g/l).

— L'indication chiffrée 1 à 4 correspond aux différentes concentrations de sulfate d'ammonium (1 : 0,5 g/l, 2 : 1 g/l, 3 : 2 g/l, 4 : 6 g/l). Le chiffre 5 indique la présence du nitrate d'ammonium dans le milieu (3,2 g/l) et le chiffre 6 la présence d'urée (2,8 g/l).

Conditions de culture.

La culture est réalisée dans des erlenmeyers de 5 l remplis au 1/10^e de leur volume. Pour assurer une agitation et une aération convenables, ces erlenmeyers sont soumis à un mouvement de va-et-vient d'une amplitude de 7 cm et d'une fréquence de 80 oscillations par min. La culture est effectuée dans une enceinte thermostatée à 28 °C.

Récolte de la biomasse.

A la fin de la croissance (en moyenne 3 jours), la culture est centrifugée (centrifugeuse Beckman, 12 000 tours/min pendant 10 min) et le mycélium est lavé à l'eau distillée puis recentrifugé. Cette biomasse humide est congelée puis lyophilisée avant d'être broyée mécaniquement et mise sous forme pulvérulente. La poudre a été conservée sous azote à + 4 °C et à l'abri de la lumière. L'extraction des lipides est effectuée sur la poudre ainsi obtenue.

Techniques analytiques.

— Détermination de la matière sèche.

Après lyophilisation, la détermination d'humidité résiduelle de la poudre microbienne se fait de la façon suivante : dans un cristalliseur on pèse une aliquote avec précision (200 mg de poudre environ) et l'échantillon est séché à l'étuve à 103 ± 2 °C jusqu'à poids constant. La perte de poids correspond au départ de l'eau et des matières volatiles.

— Extraction de l'huile.

L'extraction de l'huile est réalisée avec un appareil de Soxhlet. Après broyage, on effectue une extraction au reflux de l'hexane pendant 5 heures. Le mélange hexane-huile est recueilli, puis le solvant est éliminé par évaporation rotative sous pression réduite d'azote afin d'éviter les phénomènes d'oxydation.

— Dosage des acides gras.

La transformation de la matière grasse sous forme d'esters méthyliques s'effectue avec le méthylate de sodium et le méthanol chlorhydrique selon la méthode générale indiquée dans la norme AFNOR [14]. Les esters méthyliques sont repris par un volume connu d'hexane tel qu'on ait des solutions à 1 %. 1 µl de solution est injecté dans l'appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Conditions de CPG.

Les solutions sont analysées sur un appareil Carlo Erba 4160 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et relié à un intégrateur Delsi Enica 10. La séparation des constituants s'effectue à l'aide d'une colonne capillaire de silice fondue DB Wax 30W (J et W) dont les caractéristiques sont les suivantes : longueur = 30 m ; diamètre interne = 0,3 mm ; épaisseur du film = 0,25 µm.

Les conditions expérimentales sont les suivantes : températures : injecteur-split-splitless = 250 °C ; détecteur = 275 °C ; four = 190 °C ; gaz vecteur : hélium ; débit = 3 ml/min ; rapport de division = 1/50.

— Dosage du glucose.

Le glucose résiduel du milieu est déterminé par la méthode décrite par Bergmeyer *et al.* [15]. Le glucose est transformé en glucose - 6 - phosphate puis oxydé en présence de NADP⁺. La formation de NADPH est proportionnelle au glucose et elle est suivie au spectrophotomètre à 340 nm. L'étalonnage est effectué en utilisant du glucose pur et la courbe d'étalonnage est linéaire jusqu'à une concentration 0,4 g/l en glucose. Le glucose consommé par les champignons est ainsi évalué selon la relation suivante :

[glucose consommé] = [glucose apporté] - [glucose dosé]
et le « Rendement réel » par le rapport :

TABLEAU I. — Influence des conditions de culture sur les paramètres de croissance de *Mucor circinelloides* CBS 172-27

| MMV | Récolte de biomasse (1) | Glucose consommé (g/l) | Rendement réel (%) (2) | Protéines | Huile | GLA | GLA % dans l'huile | Production estimée du GLA (3) | Fermentation alcoolique (4) |
|-----|----------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-------|-----|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | | p 100 dans la biomasse sèche | | | | | |
| A1 | 4,1 | 16,4 | 25 | 12 | 54 | 2,8 | 5,3 | 117 | — |
| A2 | 4,4 | 17,7 | 25 | 18 | 51 | 2,7 | 5,4 | 121 | — |
| A3 | 3,5 | 20,0 | 17 | 37 | 24 | 1,6 | 6,9 | 58 | — |
| A4 | 3,5 | 20,0 | 17 | 45 | 24 | 1,4 | 5,7 | 48 | — |
| B1 | 4,5 | 35,5 | 13 | 11 | 73 | 3,3 | 4,6 | 151 | — |
| B2 | 5,1 | 35,6 | 14 | 16 | 51 | 2,5 | 5,0 | 130 | — |
| B3 | 4,1 | 35,5 | 12 | 32 | 33 | 2,0 | 6,1 | 82 | — |
| B4 | 4,6 | 35,5 | 13 | 44 | 13 | 1,1 | 8,6 | 51 | — |
| B5 | 10,1 | 40,0 | 25 | 26 | 9 | 0,7 | 8,1 | 74 | + |
| B6 | 8,1 | 40,0 | 20 | 30 | 5 | 0,6 | 12,8 | 52 | + |

TABLEAU II. — Influence des conditions de culture sur les paramètres de croissance de *Mucor rouxianus* CBS 120-08

| MMV | Récolte de biomasse (1) | Glucose consommé (g/l) | Rendement réel (%) (2) | Protéines | Huile | GLA | GLA % dans l'huile | Production estimée du GLA (3) | Fermentation alcoolique (4) |
|-----|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------|-----|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | | | p. 100 dans la biomasse sèche | | | | | |
| A1 | 1,9 | 16,6 | 11 | 27 | 23 | 2,5 | 10,9 | 48 | — |
| A2 | 2,6 | 20,0 | 13 | 33 | 19 | 2,3 | 12,3 | 61 | — |
| A3 | 3,2 | 20,0 | 16 | 44 | 7 | 1,4 | 19,6 | 44 | — |
| A4 | 3,0 | 20,0 | 15 | 44 | 8 | 1,3 | 18,7 | 40 | — |
| B1 | 2,0 | 17,8 | 11 | 18 | 20 | 2,6 | 13,1 | 52 | — |
| B2 | 3,2 | 26,0 | 12 | 25 | 20 | 2,9 | 14,6 | 93 | — |
| B3 | 4,3 | 33,3 | 13 | 35 | 13 | 2,0 | 15,2 | 85 | — |
| B4 | 4,8 | 39,2 | 12 | 37 | 10 | 1,2 | 12,3 | 59 | — |
| B5 | 2,1 | 15,5 | 14 | 47 | 4 | 0,7 | 17,7 | 15 | — |
| B6 | 3,7 | 22,6 | 16 | 28 | 3 | 0,8 | 25,9 | 29 | — |

(1) : Exprimée en g de matière sèche/l. de culture.

(2) : Rendement réel : g de matière sèche/100 g du glucose consommé.

(3) : Exprimée en mg du GLA/l. de culture.

(4) : Présence (+) ou absence (—) de fermentation alcoolique.

$$[\text{Rendement réel}] (\%) = \frac{[\text{Biomasse sèche obtenue}] (\text{g/l})}{[\text{glucose consommé}] (\text{g/l})} \times 100$$

— Dosage des protéines.

La méthode dite de Biuret [16] a été utilisée pour déterminer la teneur de la biomasse de champignons en protéines. L'étalonnage est effectué avec une solution d'albumine sérique bovine (Calbiochem). Les résultats sont exprimés en g de protéines pour 100 g de matière sèche.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Etude des souches sur les milieux MMV.

Mucor circinelloides CBS 172-27 (Tabl. I) donne dans ces conditions de culture une croissance meilleure que *Mucor rouxianus* CBS 120-8 (Tabl. II) et présente une capacité d'accumulation lipidique très importante. *M. rouxianus*, par contre, produit des huiles beaucoup plus concentrées en GLA. Les deux souches sont d'autant plus pauvres en protéines et riches en matière grasse que le milieu est plus pauvre en azote.

Dans les conditions limitantes en azote [MMV (A1), (A2), (B1), (B2)] *M. circinelloides* présente une accumulation de matière grasse très importante ; le résultat obtenu à partir du milieu MMV (B1) (73 %) est excellent.

Dans l'ensemble, *M. circinelloides* donne des croissances meilleures que *M. rouxianus*. Les meilleures récoltes sont obtenues à partir des milieux MMV (B5) et (B6) (10,1 g/l

et 8,1 g/l respectivement). Dans ces deux cas les rendements restent probablement limités par la présence de fermentation alcoolique, et l'accumulation de lipides est faible. Dans ces conditions, le champignon prend l'aspect levuriforme caractéristique des mucorales en activité fermentaire. Cette situation s'explique peut-être indirectement par la nature du substrat azoté (nitrate d'ammonium pour MMV (B5) et urée par MMV (B6)) : ces sources d'azote semblent, pour cette souche, assurer une production de biomasse trop importante pour les possibilités d'aération du milieu en erlenmeyers agités. Le dimorphisme (champignons-levures) est un phénomène assez fréquent chez les mucorales, très dépendant de l'aération et de la pression osmotique du milieu [17, 18].

M. rouxianus présente à la fois un rendement (11 à 16 %) et une récolte (1,9 à 4,8 g/l) médiocres dans toutes les conditions étudiées. Le glucose n'est totalement consommé que dans les cas des milieux MMV (A) (glucose de départ 20 g/l) pour les teneurs de sulfate d'ammonium les plus élevées. La biomasse de cette souche est très riche en protéines. Les valeurs les plus élevées sont obtenues généralement à partir des milieux MMV (A) (27-44 %). Pour une même concentration du milieu en glucose, les milieux « azote non limitant » favorisent l'enrichissement de la biomasse en protéines [MMV (A3), (A4), (B3), (B4)]. Le milieu MMV (B5) (source d'azote : nitrate d'ammonium) produit la biomasse la plus riche en protéines (47 %).

La matière grasse accumulée dans la biomasse de *M. rouxianus* varie de 3 à 23 %. Avec le sulfate d'ammonium comme source d'azote, les milieux « azote limitant »

TABLEAU III. — Composition en acides gras des huiles de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 en fonction des différents milieux de culture

| MMV | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 16:1 | 17:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 n-6 | 18:3 n-3 | 20:0 | 20:1 | 22:0 | 22:1 | 24:0 | 24:1 | Autres |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|------|------|------|------|------|------|--------|
| A1 | 0,3 | 1,0 | 3,0 | 0,4 | 29,4 | 1,4 | 0,5 | 7,7 | 33,9 | 12,6 | 5,3 | / | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 2,7 |
| A2 | 0,2 | 0,8 | 3,8 | 0,2 | 31,7 | 1,2 | 0,3 | 6,2 | 34,4 | 10,7 | 5,4 | / | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 3,3 |
| A3 | 0,5 | 0,8 | 3,5 | 0,6 | 23,4 | 2,2 | 2,1 | 6,4 | 36,5 | 11,8 | 6,9 | / | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 1,2 | 0,4 | 2,4 |
| A4 | 0,2 | 0,4 | 3,1 | 0,5 | 29,8 | 2,1 | 0,7 | 6,0 | 38,8 | 10,1 | 5,7 | / | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,7 |
| B1 | 0,4 | 0,6 | 2,7 | 0,2 | 27,5 | 1,3 | 0,6 | 9,1 | 36,7 | 13,6 | 4,6 | / | 0,5 | 0,2 | 0,5 | / | 0,8 | 0,1 | 0,6 |
| B2 | 0,1 | 0,4 | 2,8 | 0,3 | 27,9 | 1,5 | 0,7 | 7,4 | 38,1 | 13,1 | 5,0 | / | 0,4 | 0,3 | 0,4 | / | 0,6 | / | 1,0 |
| B3 | 0,3 | 0,6 | 3,2 | 0,4 | 31,3 | 2,5 | 0,9 | 6,4 | 34,2 | 10,4 | 6,1 | / | 0,4 | 0,3 | 0,5 | / | 0,8 | 0,1 | 1,6 |
| B4 | 0,5 | 0,9 | 4,2 | 0,7 | 28,6 | 2,1 | 1,6 | 5,0 | 31,3 | 11,9 | 8,6 | / | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 3,2 |
| B5 | 0,7 | 2,0 | 4,8 | 0,5 | 13,2 | 9,9 | 1,0 | 8,1 | 35,3 | 8,5 | 8,1 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,7 | 0,2 | 1,8 | 0,4 | 3,1 |
| B6 | 0,6 | 1,3 | 4,0 | 0,5 | 14,6 | 8,6 | 0,8 | 6,4 | 30,2 | 10,1 | 12,8 | 1,2 | 0,5 | 1,2 | 1,2 | 0,7 | 2,3 | 0,3 | 2,7 |

TABLEAU IV. — Composition en acides gras des huiles de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 en fonction des différents milieux de culture

| MMV | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 16:1 | 17:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 n-6 | 18:3 n-3 | 20:0 | 20:1 | 22:0 | 22:1 | 24:0 | 24:1 | Autres |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|------|------|------|------|------|------|--------|
| A1 | / | 0,3 | 2,1 | 0,9 | 26,0 | 1,2 | 1,8 | 7,7 | 30,2 | 15,2 | 10,9 | / | 0,3 | 0,3 | 0,3 | / | 0,4 | 0,1 | 2,3 |
| A2 | / | 0,4 | 1,8 | 0,9 | 22,7 | 1,3 | 2,2 | 6,8 | 33,5 | 15,4 | 12,3 | / | 0,3 | 0,3 | 0,2 | / | 0,4 | / | 1,5 |
| A3 | / | 0,3 | 2,6 | 1,2 | 21,7 | 1,5 | 2,3 | 7,2 | 22,0 | 15,5 | 19,6 | / | 0,4 | 0,4 | 0,3 | / | 0,5 | / | 4,5 |
| A4 | 0,1 | 0,4 | 2,0 | 0,8 | 22,1 | 1,0 | 2,3 | 7,4 | 25,6 | 14,4 | 16,7 | / | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,8 | 0,2 | 5,2 |
| B1 | / | 0,3 | 2,2 | 1,1 | 22,4 | 1,2 | 3,2 | 7,3 | 30,1 | 15,0 | 13,1 | / | 0,3 | 0,3 | 0,1 | / | 0,3 | / | 3,1 |
| B2 | / | 0,4 | 2,4 | 0,5 | 21,5 | 1,1 | 1,2 | 5,6 | 31,2 | 17,1 | 14,6 | / | 0,3 | 0,2 | 0,1 | / | 0,4 | 0,6 | 2,8 |
| B3 | / | 0,3 | 2,1 | 0,6 | 20,4 | 1,9 | 1,6 | 3,6 | 30,0 | 19,4 | 15,2 | / | 0,3 | 0,2 | 0,1 | / | 0,2 | 0,6 | 3,5 |
| B4 | 0,3 | 1,5 | 3,2 | 0,5 | 24,1 | 1,7 | 2,4 | 4,4 | 29,0 | 17,2 | 12,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 2,1 |
| B5 | 0,4 | 1,1 | 3,3 | 0,3 | 22,0 | 1,2 | 0,8 | 9,6 | 23,7 | 15,0 | 17,7 | / | 0,6 | 0,3 | 0,2 | / | 0,4 | / | 3,4 |
| B6 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 21,1 | 0,8 | 0,5 | 5,0 | 24,6 | 12,0 | 25,9 | / | 0,3 | 0,2 | 0,2 | / | 0,3 | 0,1 | 7,9 |

TABLEAU V. — Comparaison entre la teneur en éléments minéraux des deux souches de *Mucor* avec celle des divers milieux de culture

| | N | P | K | Ca | Mg | Na | S | Cu | Mn | Zn | Fe | B |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>M. circinelloides</i> CBS 172-27 (g/10 g MS) | 0,424 | 0,342 | 0,214 | 0,063 | 0,023 | 0,008 | 0,026 | $3,3 \times 10^{-3}$ | $0,9 \times 10^{-3}$ | $1,3 \times 10^{-3}$ | $2,5 \times 10^{-3}$ | $0,05 \times 10^{-3}$ |
| <i>M. rouxianus</i> CBS 120-08 (g/10 g MS) | 0,678 | 0,337 | 0,235 | 0,022 | 0,032 | 0,004 | 0,036 | $0,2 \times 10^{-3}$ | $0,5 \times 10^{-3}$ | $0,7 \times 10^{-3}$ | $1,9 \times 10^{-3}$ | 0 |
| MMV (A1) (g/l) | 0,106 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,186 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (A2) (g/l) | 0,212 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,307 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (A3) (g/l) | 0,424 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,550 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (A4) (g/l) | 1,273 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 1,519 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (B1) (g/l) | 0,106 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,186 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (B2) (g/l) | 0,212 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,307 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (B3) (g/l) | 0,424 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,550 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (B4) (g/l) | 1,273 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 1,519 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (B5) (g/l) | 1,210 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,065 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |
| MMV (B6) (g/l) | 1,306 | 1,817 | 2,300 | 0,036 | 0,049 | 0,039 | 0,065 | $1,6 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-4}$ | $1,6 \times 10^{-4}$ | $6,9 \times 10^{-4}$ | $0,09 \times 10^{-3}$ |

TABLEAU VI. — Croissance de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 sur milieu optimisé (M.O.) contenant 40 g/l de glucose

| | Récolte de biomasse (1) | Glucose consommé (g/l) | Rendement réel (%) (2) | Protéines p. 100 dans la biomasse sèche | Huile | GLA | GLA % dans l'huile | Production estimée du GLA (3) | Fermentation alcoolique (4) |
|---|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|-------|-----|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Mucor circinelloides</i> CBS 172-27 | 7,9 | 40 | 20 | 55 | 2 | 0,2 | 10,1 | 16 | + |
| <i>Mucor rouxianus</i> CBS 120-08 | 10,5 | 40 | 26 | 32 | 3 | 0,3 | 11,5 | 36 | + |

(1) : Exprimée en g de matière sèche/l. de culture.

(2) : Rendement réel : g de matière sèche/100 g du glucose consommé.

(3) : Exprimée en mg du GLA/l. de culture.

(4) : Présence (+) ou absence (–) de fermentation alcoolique.

(MMV (A1), (A2), (B1), (B2)) favorisent l'accumulation lipidique de cette souche ; toutefois les concentrations lipidiques observées (19 à 23 %) ne sont pas très importantes. Les biomasses obtenues à partir des milieux MMV (B4), (B5) et (B6) diffèrent significativement au niveau de l'enrichissement en matière grasse, ce qui confirme l'influence du type d'azote sur l'accumulation lipidique dans la biomasse des champignons. Les récoltes obtenues à partir des milieux MMV (B5) et (B6) (2,1 g/l et 3,7 g/l respectivement) sont plus faibles que celles obtenues à partir du MMV(B4) (4,8 g/l), milieu qui est par ailleurs celui donnant la récolte la plus importante quel que soit le milieu expérimental.

Enfin, il n'est pas inutile de remarquer que, pour les deux souches, des spores et des sporanges étaient en cours de formation dans les milieux de culture appauvris en azote ; ce fait se traduit par un jaunissement de la biomasse. L'apparition des sporanges en cours de différenciation cellulaire, visible au microscope, était plus importante pour les milieux MMV (A1) (B1) que pour les milieux MMV (A2) (B2). L'inanition azotée entraîne donc une formation des spores et se traduit par l'enrichissement de la biomasse en lipides.

Les tableaux III et IV donnent les compositions des huiles obtenues. On remarque dans tous les cas les faibles quantités des acides gras courts (C < 15) et des acides gras longs (C > 20). Ce sont les acides oléique (C 18:1) et palmitique (C 16:0) qui sont toujours les plus abondants. Pour un milieu donné, les huiles de *M. circinelloides* (Tabl. III) sont à la fois moins riches en GLA (4,6 – 12,8 %) et en acide linoléique par rapport aux huiles de *M. rouxianus* (Tabl. IV). Le GLA dans les huiles de *M. rouxianus* se trouve toujours en quantité très importante (10,9 – 25,9 %) et sa teneur est supérieure dans certains cas à l'acide linoléique (milieux MMV (A3), (A4), (B5), (B6)).

Il semble que la teneur en GLA des triglycérides diminue lorsque la richesse en huile du mycélium augmente. Ce résultat semble suggérer que l'étape de désaturation de l'acide linoléique en GLA est une étape limitante et relativement peu active, dans le mycélium ; il n'est pas impossible que le mycélium ne produise que la quantité limitée de GLA nécessaire pour le fonctionnement membranaire.

En combinant des valeurs « GLA % dans l'huile » et « Huile % dans la biomasse sèche », la concentration du GLA dans les matières sèches peut être estimée (Tabl. I et II). Cette dernière valeur montre que *M. circinelloides* est un producteur du GLA meilleur que *M. rouxianus* : le désavantage de la faible concentration du GLA dans l'huile de *M. circinelloides* est compensé par la forte teneur en lipides de la biomasse de cette souche. Enfin, du point de vue utilisation industrielle des souches, le résultat le plus

intéressant est la productivité du fermenteur en produit final : GLA mg/l de culture. La souche de *M. circinelloides* est de ce point de vue, dans les conditions limitantes en azote, beaucoup plus productive que la souche de *M. rouxianus*.

Avant le passage à une production de GLA plus intensive l'optimisation du milieu doit être effectuée afin d'améliorer les rendements.

Optimisation du milieu de culture.

Le tableau V donne la composition en éléments minéraux des deux souches de *Mucor* et permet de les comparer avec ceux des divers milieux de culture utilisés, ce qui donne une estimation des exportations provoquées par la culture des deux souches.

On remarque que certains oligoéléments (Cu, Mn, Zn, Fe) sont des facteurs limitants dans tous ces milieux pour les deux souches. Pour la souche de *M. circinelloides* le calcium est aussi un facteur limitant. Enfin, l'azote n'est limitant que dans les cas des milieux MMV (A1), (A2), (B1), (B2) pour les deux souches. Ces remarques nous ont permis de définir un milieu optimal (M.O.).

Ce milieu M.O. contient les éléments minéraux nécessaires pour une production de matières sèches de 30 g/l environ. L'urée est choisie comme source d'azote. Le milieu M.O. présente la composition finale suivante : urée = 3 g/l, phosphate monopotassique = 6 g/l, chlorure de sodium = 0,1 g/l, sulfate de magnésium ($\text{Mg SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$) = 1 g/l, chlorure de calcium = 0,6 g/l, chlorure ferrique ($\text{Fe Cl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$) = 30 mg/l, acide borique 1,3 mg/l, iodure de potassium = 1,0 mg/l, molybdate de sodium = 2,0 mg/l, sulfate de zinc = 11,0 mg/l, sulfate de cuivre = 30 mg/l, sulfate de manganèse = 10 mg/l, pantothénate de calcium = 2 mg/l, thiamine = 2 mg/l, inositol = 2 mg/l, pyridoxine = 2 mg/l, acide nicotinique = 0,5 mg/l, biotine = 0,02 mg/l.

Dans un premier temps, la source de carbone a été 40 g/l de glucose. Les résultats obtenus à partir de ce milieu optimisé sont donnés dans les tableaux VI et VII. On remarque ici la présence de fermentation comme dans le cas de *M. circinelloides* cultivé sur les milieux MMV (B5) et (B6). De même, les rendements restent toujours faibles (20 et 26 %) et l'accumulation des matières grasses est très limitée (2 et 3 %) pour *M. circinelloides* et *M. rouxianus* respectivement).

Les huiles obtenues contiennent des quantités correctes de GLA (10,1 et 11,5 %). La concentration du GLA dans les matières sèches (0,2 et 0,3 %) et la production du GLA (16 et 36 mg/l) sont mauvaises car la biomasse contient peu de lipides. Par contre, les deux souches cultivées sur le milieu M.O. produisent des biomasses très riches en protéi-

TABLEAU VII. — Composition en acides gras
des huiles de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et de *Mucor rouxianus* CBS 120-08
obtenues à partir des biomasses cultivées sur le milieu optimisé (M.O.) contenant 40 g/l de glucose

| | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 16:1 | 17:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 n-6 | 18:3 n-3 | 20:0 | 20:1 | 22:0 | 22:1 | 24:0 | 24:1 | Autres |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|------|------|------|------|------|------|--------|
| <i>Mucor circinelloides</i> CBS 172-27 | 0,2 | 2,0 | 5,6 | 0,8 | 17,8 | 11,9 | 0,7 | 7,4 | 26,6 | 7,9 | 10,1 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 1,2 | 0,2 | 1,9 | 0,7 | 3,9 |
| <i>Mucor rouxianus</i> CBS 120-08 | / | 0,1 | 4,8 | 1,0 | 15,8 | 10,0 | 0,8 | 4,9 | 27,2 | 12,5 | 11,5 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,8 | / | 0,6 | 0,4 | 7,8 |

TABLEAU VIII. — Croissance de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 sur milieu optimisé (M.O.) contenant 20 g/l de glucose

| | Récolte de biomasse (1) | Glucose consommé (g/l) | Rendement réel (%) (2) | Protéines p. 100 dans la biomasse sèche | Huile | GLA | GLA % dans l'huile | Production estimée du GLA (3) | Fermentation alcoolique (4) |
|--|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--|-------|-----|--------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>Mucor circinelloides</i> CBS 172-27 | 8,0 | 20 | 40 | 42 | 17 | 2,6 | 15,4 | 209 | — |
| <i>Mucor rouxianus</i> CBS 120-08 | 8,0 | 20 | 40 | 41 | 11 | 1,6 | 14,8 | 130 | — |

(1) : Exprimée en g de matière sèche/l. de culture.

(2) : Rendement réel : g de matière sèche/100 g du glucose consommé.

(3) : Exprimée en mg du GLA/l. de culture.

(4) : Présence (+) ou absence (—) de fermentation alcoolique.

TABLEAU IX. — Composition en acides gras des huiles de *Mucor circinelloides* CBS 172-27 et de *Mucor rouxianus* CBS 120-08 obtenues à partir des biomasses cultivées sur le milieu optimisé (M.O.) contenant 20 g/l de glucose

| | 10:0 | 12:0 | 14:0 | 15:0 | 16:0 | 16:1 | 17:0 | 18:0 | 18:1 | 18:2 | 18:3 n-6 | 18:3 n-3 | 20:0 | 20:1 | 22:0 | 22:1 | 24:0 | 24:1 | Autres |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|------|------|------|------|------|------|--------|
| <i>Mucor circinelloides</i> CBS 172-27 | 0,1 | 0,4 | 2,4 | 1,6 | 12,6 | 7,9 | 0,5 | 3,4 | 31,9 | 11,1 | 15,4 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,7 | / | 0,9 | 0,3 | 9,9 |
| <i>Mucor rouxianus</i> CBS 120-08 | 0,1 | 0,2 | 1,4 | 0,5 | 12,3 | 7,2 | 0,7 | 4,3 | 28,7 | 11,5 | 14,8 | / | 0,5 | 0,4 | 0,8 | 1,3 | 1,1 | 0,7 | 13,5 |

nes (respectivement 55 et 35 % pour *M. circinelloides* et *M. rouxianus*). Il est probable que l'aération est insuffisante dans les conditions expérimentales utilisées pour permettre une bonne croissance sur le milieu M.O. contenant 40 g/l, ce qui a motivé par la suite une diminution dans le M.O. du taux de glucose qui a été réduit à 20 g/l seulement.

Les résultats obtenus à partir de ce milieu sont donnés aux tableaux VIII et IX. On remarque qu'une bonne récolte en matière sèche (8 g/l) est obtenue avec un rendement correct (40 %). Le GLA dans les huiles se trouve aux concentrations respectives de 15,4 % et 14,8 % pour *M. circinelloides* et *M. rouxianus*. Les biomasses sont riches en protéines et relativement pauvres en lipides. L'amélioration simultanée de la récolte en matière sèche et de la teneur en GLA de l'huile permet d'obtenir une bonne production du GLA exprimée en mg/l.

CONCLUSION

L'analyse des cendres des 2 souches de *Mucor* utilisées permet de définir les besoins en éléments minéraux : il en résulte la possibilité de préconiser un milieu de culture optimisé pour la croissance. La limitation en azote du milieu provoque une accumulation relativement importante de lipides dans la cellule. Mais, par contre, la teneur en GLA de cette même huile diminue comme si les possibilités de biosynthèse du GLA étaient limitées dans la cellule.

Inversement, un excès d'azote dans le milieu augmente la teneur en protéines de la biomasse et provoque une baisse relative de la teneur en lipides.

Il semble que l'urée constitue une source d'azote plus efficace pour la croissance que l'ammoniaque ; cette remarque mériterait d'être précisée.

Le facteur limitant de la croissance est souvent, expérimentalement, le manque d'aération. Dans certains cas, une fermentation alcoolique se produit au détriment de la croissance cellulaire. Cette observation n'est pas étonnante, compte tenu des importants besoins en oxygène des mucoracées. Il est probable que ce facteur jouerait un rôle essentiel dans le cas d'une production en fermenteur industriel.

En conclusion, il paraît possible d'obtenir avec *M. circinelloides* les résultats suivants : rendement matière sèche/glucose 40 %, teneur en huile dans la biomasse sèche 15-20 %, teneur en GLA des triglycérides 15 % environ, ce qui serait en soi des résultats très convenables. Cependant, il n'est possible d'envisager une production industrielle que si les conditions de travail en fermenteur permettent une production suffisamment importante par unité du volume avec une vitesse de croissance convenable. Dans les conditions d'aération en erlenmeyers agités, une production estimée de GLA de 200 mg/l en 48 h environ constitue une productivité trop faible du point de vue économique. Il n'est pas exclu toutefois, que la production par unité de volume et la vitesse de croissance puissent être l'une et l'autre améliorées dans le cas d'une utilisation de fermenteurs industriels bien adaptés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRENNER R. R., DETOMAS M. E. and PELUFFO R. O. (1965). — Effect of polyunsaturated fatty acids on the desaturation *in vitro* of linoleic to gamma linolenic acid *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, p. 640-642.
- [2] MARCEL Y. L., KRISTIANSEN K. and HOLMAN R. T. (1968). — The preferred metabolic pathway from linoleic acid to arachidonic acid *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **164**, p. 25-34.
- [3] CONNER L. R., BURNESS B. and FERGUSON A. K. (1984). — Fatty acid desaturase specificity in *Tetrahymena*. *Lipids*, **19**, p. 285-288.
- [4] PINA M., GRAILLE J., GRIGNAC P., LACOMBE A., QUENOT O. et GARNIER P. (1984). — Recherche d'œnothères riches en acide gamma linoléique. *Oléagineux*, **39**, N° 12, p. 593-596.
- [5] LACOMBE A., QUENOT O., GRIGNAC P., GRAILLE J., PINA M. et GARNIER P. (1985). — Tentative de production d'acide gamma linoléique par la culture de l'onagre (genre *Oenothera*). *Oléagineux*, **40**, N° 1, p. 35-40.
- [6] UZZAN A. (1986). — L'huile de bourrache : une huile pleine d'avenir. *Rev. Fr. Corps Gras*, **33**, p. 385-389.
- [7] POISSON J. P., LEMARCHAL P. et BLOND J. P. (1978). — Influence of alloxan diabetes on the conversion of linoleic and gamma linolenic acids to arachidonic acid in the rat *in vitro*. *Diab. Metab.*, **4**, p. 39-45.
- [8] SHAW R. (1965). — The occurrence of gamma linolenic acid in fungi. *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, p. 230-277.
- [9] AGGELIS G., PINA M., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GRAILLE J., GALZY P., MARTIN-PRIVAT P. et PERRAUD J. P. (1987). — Production d'huiles riches en acide gamma linoléique par diverses souches de Phycomycètes. *Oléagineux*, **42**, N° 10, p. 379-386.
- [10] RATLEDGE C. (1978). — Lipids products of metabolism., Economic Microbiology, (ROSE, A. H. ed.) Academic Press Vol 2, p. 263-302.
- [11] BOTHAM P. A. and RATLEDGE C. (1979). — A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.*, **114**, p. 361-375.
- [12] RATLEDGE C. and HALL M. (1979). — Accumulation of lipid by *Rhodotorula glutinis* in continuous culture. *Biotechnology*, **1**, p. 115-120.
- [13] GALZY P. (1964). — Etude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *Ann. Technologie Agricole*, **13**, 114 p.
- [14] AFNOR (1984). — Recueil de Normes Françaises des Corps Gras, graines oléagineuses et produits dérivés. 3^e éd., NF T 60-233, p. 95.
- [15] BERGMAYER H. U., BERNT E., SCHMIDT F. and STORK H. (1974). — Methods of enzymatic analysis (Bergmayer, H. U. ed.), Verlag Chemie, Vol 3, Nernheim, p. 1196-1201.
- [16] STICKLAND L. H. (1951). — The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, p. 698-701.
- [17] BARTNICKI-GARCIA S. (1963). — Mold-yeast dimorphism of *Mucor*. *Bacteriol. Rev.*, **27**, p. 293-303.
- [18] BARTNICKI-GARCIA S. (1967). — Control of dimorphism in *Mucor rouxii* by hexose : Catabolite repression of hyphal morphogenesis. *Bacteriol. Proceed*, **67**, 123 p.

SUMMARY

Study of the effect of growing conditions on the gamma linolenic content of *Mucor* strains.

G. AGGELIS, R. RATOMAHENINA, A. ARNAUD, P. GALZY, P. MARTIN-PRIVAT, J. P. PERRAUD, M. PINA and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 7, p. 311-317.

Gamma linolenic acid (GLA) is a much sought-after fatty acid due to its biological properties. *Mucor circinelloides* CBS 172-27 and *Mucor rouxianus* CBS 120-08 are two Mucorales whose oils are rich in this fatty acid. These two strains were cultured on different media and certain growth parameters and the cellular triglyceride fatty acid composition were studied. Nitrogen type and concentration and glucose concentration in the culture medium considerably affect the compositions of the two strains. The poorer the medium in nitrogen, the poorer are the biomasses obtained in proteins and the richer in fat. The general composition of the oils is relatively constant and is little dependent upon the culture medium; on the other hand, it seems that the two strains produce oils more concentrated in GLA when the biomasses are poorer in fats. The mineral composition of the strains was studied and an optimum medium was developed. Good dry matter yields were obtained using this medium, along with good GLA production.

RESUMEN

Estudio de la influencia de las condiciones de cultivo en el contenido de ácido gamma linoléico de cepas de *Mucor*.

G. AGGELIS, R. RATOMAHENINA, A. ARNAUD, P. GALZY, P. MARTIN-PRIVAT, J. P. PERRAUD, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, **43**, N° 7, p. 311-317.

El ácido gamma linoléico (GLA) es un ácido graso muy apreciado por sus propiedades biológicas. *Mucor circinelloides* CBS 172-27 y *Mucor rouxianus* CBS 120-08 son dos mucorales que dan aceites con alto contenido de este ácido graso. Estas dos cepas se cultivaron en diversos medios, y algunos parámetros de crecimiento se estudiaron, como también la composición de ácidos grasos de triglicéridos celulares. La concentración y el tipo de nitrógeno, como también la concentración de glucosa en el medio de cultivo ejercen mucha influencia en la composición de las dos cepas. Las biomásas obtenidas son tanto más pobres en proteínas y ricas en grasas cuanto que el medio de cultivo es más pobre en nitrógeno. La composición general de aceite es relativamente constante, y depende poco del medio de cultivo; en cambio parece que las dos cepas producen aceites de mayor concentración de GLA en el caso de que las biomásas sean más pobres en grasas. El estudio de la composición mineral de las cepas se llevó a cabo, y se ha desarrollado un medio óptimo. A partir de este medio, se obtuvo buenos rendimientos de materia seca como también una buena producción de GLA.

